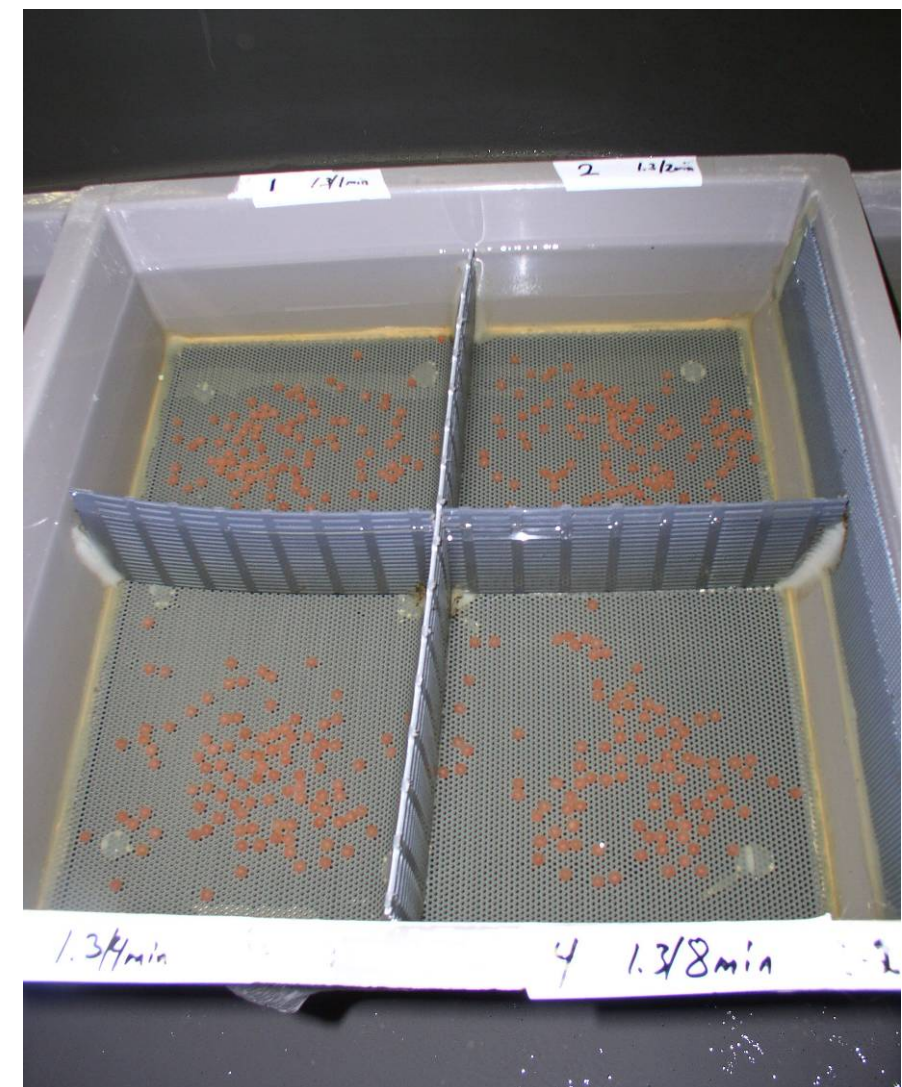




RAPPORT LNR 5158-2006

Desinfeksjon av IPNV- infiserte lakseegg med ozon



Hovedkontor

Postboks 173, Kjelsås
0411 Oslo
Telefon (47) 22 18 51 00
Telefax (47) 22 18 52 00
Internet: www.niva.no

Sørlandsavdelingen

Televeien 3
4879 Grimstad
Telefon (47) 37 29 50 55
Telefax (47) 37 04 45 13

Østlandsavdelingen

Sandvikaveien 41
2312 Ottestad
Telefon (47) 62 57 64 00
Telefax (47) 62 57 66 53

Vestlandsavdelingen

Nordnesboder 5
5005 Bergen
Telefon (47) 55 30 22 50
Telefax (47) 55 30 22 51

Midt-Norge

Postboks 1266
7462 Trondheim
Telefon (47) 73 54 63 85 / 86
Telefax (47) 54 63 87

Tittel Desinfeksjon av IPNV-infiserte lakseegg med ozon	Løpenr. (for bestilling) 5158-2006	Dato 6. april 2006
	Prosjektnr. Undernr. 24305	Sider Pris 18
Forfatter(e) Helge Liltved Christian Vogelsang	Fagområde Vannbehandling	Distribusjon
	Geografisk område	Trykket NIVA

Oppdragsgiver(e) Sjøtroll Havbruk AS	Oppdragsreferanse
---	-------------------

Sammendrag

Prosjektet ble gjennomført i samarbeid med Sjøtroll Havbruk AS, som har ønsket å prøve ut desinfisering av lakserogn med ozon som et mulig alternativ til tradisjonell Buffodine-behandling. Prosjektets hovedmål har vært å komme fram til en prosedyre for ozondesinfeksjon, d.v.s. finne hvilke konsentrasjoner og kontakttider som er nødvendig for inaktivering av IPNV-virus som sitter på eggoverflatene, samtidig som behandlingen ikke skal gi skade på egg og yngel. Det er også laget et forslag til en beskrivelse av hvordan slik ozonbehandlingen kan gjennomføres i praksis.

Resultatene tyder på at IPNV-virus som sitter på eggoverflater kan inaktiveres med ozon. For å oppnå høy grad av inaktivering (99-99,9 %) kreves konsentrasjoner i området 3-9 mg O₃/l og en kontakttid på ca. 10 minutter. Noe lavere kontakttid kan være tilstrekkelig ved høyeste konsentrasjon. Negative effekter på egg og tidlig yngelstadium ble ikke observert ved konsentrasjoner opp til 4,1 mg O₃/l og 8 minutters kontakttid, som var høyeste dose testet i forhold til effekter på egg og yngel.

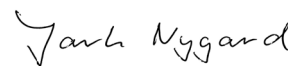
Fire norske emneord	Fire engelske emneord
1. Overflatedesinfeksjon	1. Surface disinfection
2. Lakseegg	2. Salmon egg
3. Ozon	3. Ozone
4. IPNV-virus	4. IPNV-virus



Helge Liltved
Prosjektleder



Helge Liltved
Forskningsleder
ISBN 82-577-4872-2



Jarle Nygard
Fag- og markedsdirektør

Desinfeksjon av IPNV-infiserte lakseegg med ozon

Forord

Prosjektet har blitt gjennomført av NIVA i samarbeid med Sjøtroll Havbruk AS og PatoGen Analyse AS. De praktiske forsøkene ble gjennomført ved Sjøtrolls anlegg Saltverket, Osterøy, og ved ILAB (Høytetnologisenteret i Bergen). Fra Sjøtroll Havbruk AS har følgende deltatt i gjennomføringen: Inge Haugland, Bjørn Helge Kleppe og Thoralf Solberg. Fra PatoGen Analyse har Magnus Devold og Vidar Aspehaug deltatt, mens Christian Vogelsang og Helge Liltved har gjennomført prosjektet fra NIVAs side.

Grimstad 7. april 2006

Helge Liltved

Innhold

Sammendrag	5
1. Innledning	6
2. Materialer og metoder	7
2.1 Generelt om metodikk	7
2.1.1 Måling av ozon i vann	7
2.1.2 Virusdyrkning og bestemmelse	8
2.2 Eksponering av lakseegg for ulike ozonkonsentrasjoner for bestemmelse av ozontoleranse	8
2.3 Ozonbehandling av egg med IPN-virus for å vurdere effekten av behandlingen	8
2.3.1 Virusforsøk 1	8
2.3.2 Virusforsøk 2	9
2.3.3 Virusforsøk 3	9
2.3.4 Kvantifisering av virus utenpå egg	9
3. Resultater og diskusjon	11
3.1 Eksponering av lakseegg til ozonert vann	11
3.2 Ozonbehandling av egg med IPN-virus	12
3.2.1 Resultater fra virusforsøk 1	12
3.2.2 Resultater fra virusforsøk 2	13
3.2.3 Resultater fra virusforsøk 3	14
3.2.4 Forslag til prosessløsning for desinfisering av egg med ozon i fullskala	17
4. Referanser	18

Sammendrag

Laksenæringen i Norge har store utfordringer knyttet til bekjempelse av IPNV (infeksiøs pancreas nekrose virus). Det er et ønske om å sikre at IPN-smitte ikke overføres via rogn. Dette kan trolig gjøres ved effektiv desinfisering av rogn før levering. Fordi det er knyttet usikkerhet til om tradisjonell Buffodinebehandling gir tilstrekkelig beskyttelse har Sjøtroll Havbruk AS ønsket å prøve ut ozonering som en mulig alternativ behandling.

Prosjektets hovedmål har vært å komme fram til en prosedyre for desinfisering av lakseegg ved hjelp av ozon, d.v.s. finne hvilke konsentrasjoner og kontakttider som er nødvendig for inaktivering av IPN-virus som sitter på eggoverflatene, samtidig som behandlingen ikke skal gi skade på egg og yngel. Det er også laget et forslag til en beskrivelse av hvordan selve ozonbehandlingen kan gjennomføres i praksis.

Forsøk for å undersøke eventuelle negative effekter av å eksponere lakseegg (øyerogn) for ozon ble gjennomført ved Sjøtrolls anlegg på Saltverket, Osterøy. Utviklingen i grupper av egg eksponert til ulike ozonkonsentrasjoner og kontakttider ble fulgt, og klekkeprosent og eventuell forsinket klekking, samt dødelighet og eventuell feilutvikling i en 2 månedersperiode etter klekking ble registrert. Det ble ikke funnet negative effekter eller økt dødelighet i noen av gruppene, selv ikke ved den høyeste konsentrasjonen på 4,1 mg O₃/l og 8 minutters kontakttid, tilsvarende en dose på 33 mg×min/l.

For å finne ut hvilke ozondoser som skal til for å inaktivere IPNV som er festet til overflatene på lakseegg ble det gjennomført forsøk med ozonering av infiserte egg. Innledende forsøk viste en viss nedgang i virus-titer ved ozondoser større enn 10 mg×min/l (2-5 mg O₃/l og kontakttider på 5-10 minutter). Det var imidlertid et problem å få tilstrekkelig mange viruspartikler til å feste seg til eggoverflatene, noe som er nødvendig for å påvise høy grad av inaktivering. For å løse problemet ble eggene dyppet i en alginatgel før bading i virussuspensjon og etterfølgende ozonering. Dette ga høyere virustall. Det ble vist at ved en ozonkonsentrasjon på 10,5 mg/l fikk man full inaktivering til under deteksjonsgrensen allerede etter 2 min eksponering, tilsvarende en inaktivering på tilnærmet 99,9 %. Lavere ozonkonsentrasjoner (0,9-1,3 mg O₃/l og 2,8-3,1 mg O₃/l) ga noe dårligere resultat. Det ble imidlertid oppnådd i overkant av 99 % inaktivering etter 10 min ved 2,8 mg O₃/l.

Behandling med 1 % Buffodine i 10 minutter så ut til å gi god effekt i de innledende forsøkene, men redusert effekt når virus innstøpt i alginat ble benyttet.

Resultatene tyder på at IPN virus som sitter på eggoverflater kan inaktiveres med ozon. For høy grad av inaktivering kreves konsentrasjoner i området 3-9 mg O₃/l og en kontakttid på ca. 10 minutter. Noe lavere kontakttid kan være tilstrekkelig ved høyeste ozonkonsentrasjon. Negative effekter på egg og tidlig yngelstadium ble ikke observert ved konsentrasjoner opp til 4,1 mg O₃/l og 8 minutters kontakttid, som var høyeste dose testet i forhold til effekter på egg og yngel.

1. Innledning

Laksenæringen i Norge har store utfordringer knyttet til å bekjempe IPN (infeksiøs pancreas nekrose) virus. Når laks som er bærer av IPN-virus gyter, er det dokumentert at virus kan overføres vertikalt til avkommet via egg. Fra rognprodusentenes side er det ønskelig å eliminere denne muligheten i størst mulig grad ved å gjennomføre en effektiv desinfeksjon av rogn før utlevering. Også andre virus, bakterier og sopp kan skape problemer.

For desinfisering av lakseegg benyttes iodoformer (Buffodine) rutinemessig, men effekten overfor IPN-virus er noe omdiskutert. I forsøk utført ved NIVA og NINA i 1991 ble det vist 99,9 % inaktivering av IPNV knyttet til øyerogn av laks ved eksponering til 100 ppm fritt jod i 10 minutter (Rosseland og medarb. 1991). I ett av to forsøk ble det imidlertid påvist overlevende virus ved denne behandlingen. Noe overraskende ble det vist at bakterien *Yersinia ruckeri* var mer motstandsdyktig overfor Buffodine enn IPNV. I "Fakta om IPN" utgitt av VESO (2003) blir det hevdet at "enkelte forsøk med iodoformer har vist manglende effekt ved desinfisering av rogn ved 100 ppm som er vanlig dosering".

Ozon har ikke tidligere blitt benyttet for overflatedesinfisering av lakseegg, men metoden benyttes i stor utstrekning for egg av marin fisk, spesielt kveite. Forsøk utført av Grotmol og Totland (2000) tyder på at metoden har effekt overfor nodavirus.

Det er vist at egg fra fisk tåler relativt høye ozonkonsentrasjoner. I en publisert artikkel (Asbury og Coler 1980) blir det vist at ozondosen som gir 50 % dødelighet (LC_{50}) for egg fra "Common sucker" er høyere enn 5,9 mg/l ozon i 10 minutter. For "Fathead minnow" egg var LC_{50} 4.4 mg/l ozon i 20 minutter. Forsøk med egg fra marin fisk (torsk, piggvar og kveite) har vist at disse tålte 2 mg O_3 /l i 2 minutter uten negative effekter (Grotmol og medarb. 2003). Ved 4 mg O_3 /l i 1 minutt eller høyere ble det imidlertid registrert nedsatt klekkeprosent.

Det er tidligere blitt hevdet at ozonering er en effektiv metode for inaktivering av IPNV. Imidlertid har nye forsøk med IPNV i sjøvann vist at det må høye doser til for inaktivering IPNV og nodavirus (Liltved og medarb. 2006). Det er også vist at mikroorganismer som er knyttet til overflater har større toleranse for desinfeksjonsmidler enn frittlevende organismer (Berman og medarb. 1988). Effekten av ozon overfor IPNV som sitter på eggoverflater er ikke kjent.

Målsetning med prosjektet

Prosjektets hovedmål var å komme fram til en prosedyre for desinfisering av lakseegg v.h.a. ozon som kan bidra til at Sjøtroll kan levere lakseegg og yngel fri for IPNV-smitte. Dette vil kunne gi bedre pris på rogn og yngel, samt skape nye markeder. På sikt er det mulig at metoden kan bli innført som standardmetode for behandling av egg i Norge, og derved bidra til reduserte problemer med IPN i oppdrettsanlegg på nasjonalt nivå.

Prosjektet bestod av følgende delmål:

1. Bestemme tålegrensen til lakseegg med hensyn til ozon. Den maksimale ozondosen (ozonkonsentrasjon x kontakttid) bestemmes ut fra at ozoneringen ikke skal ha negative effekter på lakseeggene målt som økt dødelighet eller redusert/forsinket klekking. Disse forsøkene ble gjennomført ved Sjøtrolls anlegg på Saltverket, Osterøy.
2. Gjennomføre smitteforsøk med IPN-virus for å vise at behandlingen har effekt. Det benyttes ozondoser fra del 1 i prosjektet. Lakseegg eksponeres for IPN-virus, og eggene ozoneres med

ulike doser. Levende IPN-virus assosiert med lakseegg detekteres før og etter behandlingen. Eventuelle skader på eggene registreres. Disse forsøkene ble gjennomført ved smittelaboratoriet til ILAB i Bergen. På bakgrunn av resultatene fra disse forsøkene var målsettingen å kunne gi anbefalinger om nødvendige konsentrasjoner og kontakttider.

3. Komme fram til en prosedyre for fullskala ozonbehandling av lakseegg, inkludert en skisse av hvordan et fullskala anlegg bør bygges.

De mest sentrale utfordringene når det gjaldt gjennomføring av prosjektet viste seg å være følgende:

- Problemer med å få viruspartiklene til å feste seg til overflaten av eggene, noe som ga problemer med å måle effekter ved ozonbehandlingen
- Ozon forbrukes under eksponeringen (luftes ut, oksydering av ulike forbindelser), noe som nødvendiggjør kontinuerlig tilførsel av ozon for å holde konstant ozonkonsentrasjon.
- Den reelle ozonkonsentrasjonen på overflaten av eggene blir høyere jo større væskehastigheten er rundt eggene, men samtidig øker dette sjansen for at viruspartiklene løsner fra overflaten.

Tiltak for å løse de overnevnte problemene har blitt lansert i løpet av prosjektet.

2. Materialer og metoder

2.1 Generelt om metodikk

2.1.1 Måling av ozon i vann

To metoder for måling av ozonkonsentrasjoner ble benyttet i prosjektet; indigometoden og DPD-metoden:

Indigometoden: Ved surgjøring av prøven (pH 2.5) vil ozon avfarge indigo, noe som registreres spektrofotometrisk ved 600 nm. Metoden er sensitiv og vil, i følge litteraturen, også inkludere hypobromsyre og hypobromittion dersom disse er tilstede. Den vil ikke influeres av andre sekundære oksidanter som ozonider og peroksider. Indigo-reagenset er tilsatt malonsyre som maskerer påvirkning av klor. Praktiske erfaringer tilsier at metoden er egnet for måling av ozon i ferskvann, men ikke for måling av totale restoksidanter (TRO) i sjøvann.

DPD-metoden: I prosjektet ble såkalt kolorimetrisk DPD benyttet. Metoden er basert på at ozon oksiderer N,N-dietyl-*p*-fenylendiamin (DPD) til et rosa Wurster-kation som kvantifiseres spektrofotometrisk ved 530 nm. Ved bruk av et enkelt fotometer ved bestemmelsen framstår DPD-metoden som en sensitiv og velegnet metode for måling av ozon, men andre oksidanter som dannes ved ozonering kan interferere, spesielt bromoksidanter dersom det finnes bromid i vannet.

Indigometoden angir ozonkonsentrasjonen direkte som mg O₃/l. DPD-metoden angir ozonkonsentrasjonen som klorekvivalenter, mg Cl₂/l. Sammenhengen mellom ozonkonsentrasjon og klorkonsentrasjon er som følger: [O₃] = 0,68 × [Cl₂]

2.1.2 Virusdyrkning og bestemmelse

Infeksiøs Pankreas Nekrose virus (IPNV) (stamme N1) ble benyttet som testorganisme i forsøkene. Til oppformering av IPNV ble CHSE-214 celler benyttet som ble dyrket ved 22°C i ca 7 dager i 75 cm² flasker/ 96 brønners brett med Eagle's minimal essential medium (E-MEM, Invitrogen, Paisley, UK) tilsatt FCE 10 % serum og 1 % l-glutamine. Etter 7 dager ble cellene splittet til nye flasker/brett i forholdet 1:3. Cellekulturene ble smittet med IPNV supernatant fortynnet 1:200 i celledyrkingsmedium uten tilsats av FCE. IPNV ble høstet ved tydelig cytopatogen effekt (CPE) på cellekulturene, og viruskonsentrasjonen ble bestemt som TCID₅₀/ml ("Tissue culture 50 % infective dose per millilitre") ved titrering.

Prøvene fra desinfeksjonsforsøket ble satt opp i en 10-fold fortynningsserie og titrert ut på 96 brønners brett med CHSE celler i 2 paralleller. Etter 7 dager ble brettene lest av med tanke på CPE, og TCID₅₀/ml ble beregnet.

2.2 Eksponering av lakseegg for ulike ozonkonsentrasjoner for bestemmelse av ozontoleranse

Forsøkene ble gjennomført for å undersøke hvor høye ozondoser (konsentrasjon x kontaktid) lakseegg tåler. Forsøkene ble gjennomført ved Sjøtrolls anlegg på Saltverket, Osterøy. Det ble benyttet lakseegg (fullsøskengruppe) fra Sjøtroll. Det ble talt opp 100 rognkorn i hver forsøksgruppe. Ozonholdig ferskvann ble innledningsvis laget i et gjennomstrømningssystem, men da man ikke kom høyt nok i ozonkonsentrasjon ble det avslutningsvis benyttet vann ozonert satsvis. I gjennomstrømningssystemet ble gruppene av lakseegg eksponert for ozonkonsentrasjoner i området fra 0,39 til 1,02 mg/l, mens konsentrasjonene i de satsvise forsøkene var 1,8 og 4,1 mg/l. Kontaktidene varierte fra 1 til 8 minutter. Etter ozoneksponering ble gruppene holdt adskilt i rennende som vist på rapportens forside. Vanntemperaturen ved start den 8. desember 2004 var 8,4°C, mens den ved ferdig klekking den 1. januar 2005 var 7,5°C. Yngelen ble fulgt fram til 28. februar 2005. På dette tidspunktet var vanntemperaturen 6,5°C. Antall døde egg, uklekte egg, samt døde yngel i hver av gruppene ble registrert.

2.3 Ozonbehandling av egg med IPN-virus for å vurdere effekten av behandlingen

Det ble gjennomført smitteforsøk med ulike ozondoser for å undersøke effekten av behandlingen med tanke på inaktivering av IPN-virus. Ulike grupper lakseegg ble eksponert for IPNV-virus, og eggene ble behandlet med ozonert ferskvann. Effekten av behandlingen ble evaluert ved å måle levende virus før og etter ozonering. Disse forsøkene ble utført i samarbeid med ILAB (Høyteknologisenteret i Bergen).

Da det underveis i prosjektet viste seg å oppstå problemer med gjennomføringen, spesielt med å få nok virus til å feste seg til eggoverflatene, samt løsriving av virus under ozoneksponering, ble det benyttet ulike metodikk i de ulike delforsøkene som beskrevet nedenfor:

2.3.1 Virusforsøk 1

I forsøkene som ble gjennomført i februar 2005 ble eggene eksponert for virussuspensjon i 30 min. Deretter ble eggene overført i en ren hov til plastdunk med ozonert vann. Eggene ble eksponert ved å bevege hoven sakte i det ozonerte vannet. Ulike kontaktider ble benyttet, fra 0 til 8 minutter. Ozonkonsentrasjonen ble målt ved start og ca hvert annet minutt under hele eksponeringen ved bruk

av indigometoden. Etter eksponering ble eggene overført til bad med natriumtiosulfat for nøytralisering av restozon.

2.3.2 Virusforsøk 2

I forsøkene som ble gjennomført i mars 2005 ble eggene lagt i en konsentrert virussuspensjon i 90 min før ozonering. Grupper av 27 egg ble eksponert for ozonholdig vann i en gjennomstrømningsreaktor (eggene lå i en nettkurv med god vanngjennomstrømning). Det ble benyttet konsentrasjoner fra 0 til 18 mg/l og kontakttider på 2 og 10 minutter. Ozonkonsentrasjonen ble målt ved start og ca hvert annet minutt under hele eksponeringen ved bruk av indigometoden.

2.3.3 Virusforsøk 3

For å omgå problemene med å få et tilstrekkelig antall virus til å feste seg til eggoverflatene, og for å unngå løsriving av virus, ble nye forsøk gjennomført i desember 2005. Følgende strategier ble benyttet:

Alternativ 1: Eggene ble lagt i virussuspensjonen i 90 min og så overført til eksponeringskaret (Figur 1) med kontinuerlig rolig gjennomstrømning av ozonert ferskvann. Den rolige gjennomstrømningen vil kunne sikre at en større andel av virusene sitter igjen på overflaten ved endt eksponeringstid.

Alternativ 2: Et tynt (ca 0,1 mm) lag alginatgel (>98 % vann) med innstøpte viruspartikler ble etablert utenpå eggene. Det høye vanninnholdet i alginatgelen tillater tilnærmet fri diffusjon av ozon inn til viruspartiklene, noe som gjør at dette ikke er helt ulikt hva man kan forvente i naturen. Alginat er også en relativt vanlig bestanddel i biofilmer. Alginatgelen inneholdt en høy viruskonsentrasjon. Eggene ble eksponert for ozon i samme forsøksoppsett som for Alt. 1. Etter eksponeringen ble eggene lagt i fosfatbuffer der alginatgelen løste seg opp og viruspartiklene ble frigjort. Stabiliteten til alginat ved eksponering for ozon ble testet i forkant av forsøkene.

Det ble benyttet 4 kontrollgrupper med egg i tillegg til en virussuspensjonskontroll. I tillegg blir en gruppe testet på Buffodin ved standard konsentrasjon og eksponeringstid. Detaljer angående konsentrasjoner og eksponeringstider er gitt i Tabell 5. På grunn av den høyere saltkonsentrasjonen ble ozon-/TRO-konsentrasjonen målt v.h.a. DPD-metoden.

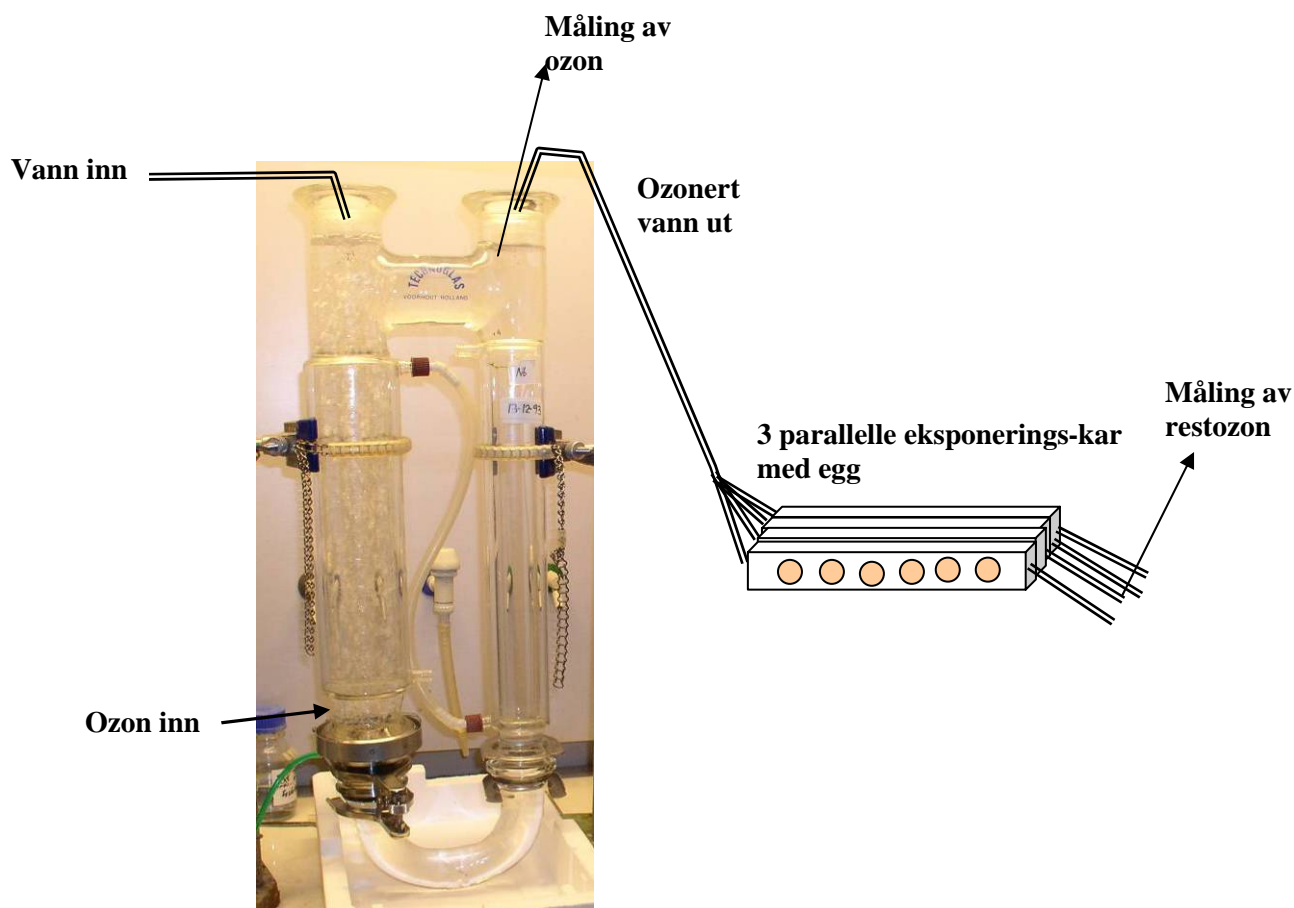
Det ble benyttet ubefruktede lakseegg strøket ut dagen før forsøket. For å hindre svelling under forsøkene ble vann med fysiologisk saltkonsentrasjon (0,9 % NaCl) benyttet. Siden alginatgelen vil swelle ved for høyt Na/Ca-forhold, ble 50 % av NaCl byttet ut med CaCl_2 ; 4,5 g/l NaCl + 6,0 g/l $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$. Det endelige forsøksoppsettet er vist i Figur 1 og Figur 2. Det ble benyttet 4 egg i hvert eksponeringskammer. Egg uten alginat ble eksponert for virussuspensjon i 90 min. Alginatfilm ble etablert på egg ved å dyppe eggene i alginat/virusløsning (15 ml 2 % alginat + 5 ml virussuspensjon) med pinsett og overført til 0,1 M CaCl_2 -løsning fra en viss høyde for å gi alginatløsningen litt tid til å fordele seg utover egget. Ca 15 min gelingstid.

Etter ozoneksponeringen ble eggene nøytralisert i 5 g/l natriumtiosulfatløsning i 10-30 min. Egg uten alginat ble skylt med rent testvann og to og to egg ble homogenisert før kvantifisering av levende virus. Egg med alginat ble overført til 4 ml PBS (0,2 M fosfatbuffer + 0,9 % NaCl) i ca 1 time. Når eggene ble inspisert ved mikroskopering etter denne behandlingen, så dette ut til å være tilstrekkelig for å løse opp alginatgelen. PBS med oppløst alginat ble kvantifisert for virus, mens eventuelle virus på selve eggene ikke ble forsøkt kvantifisert.

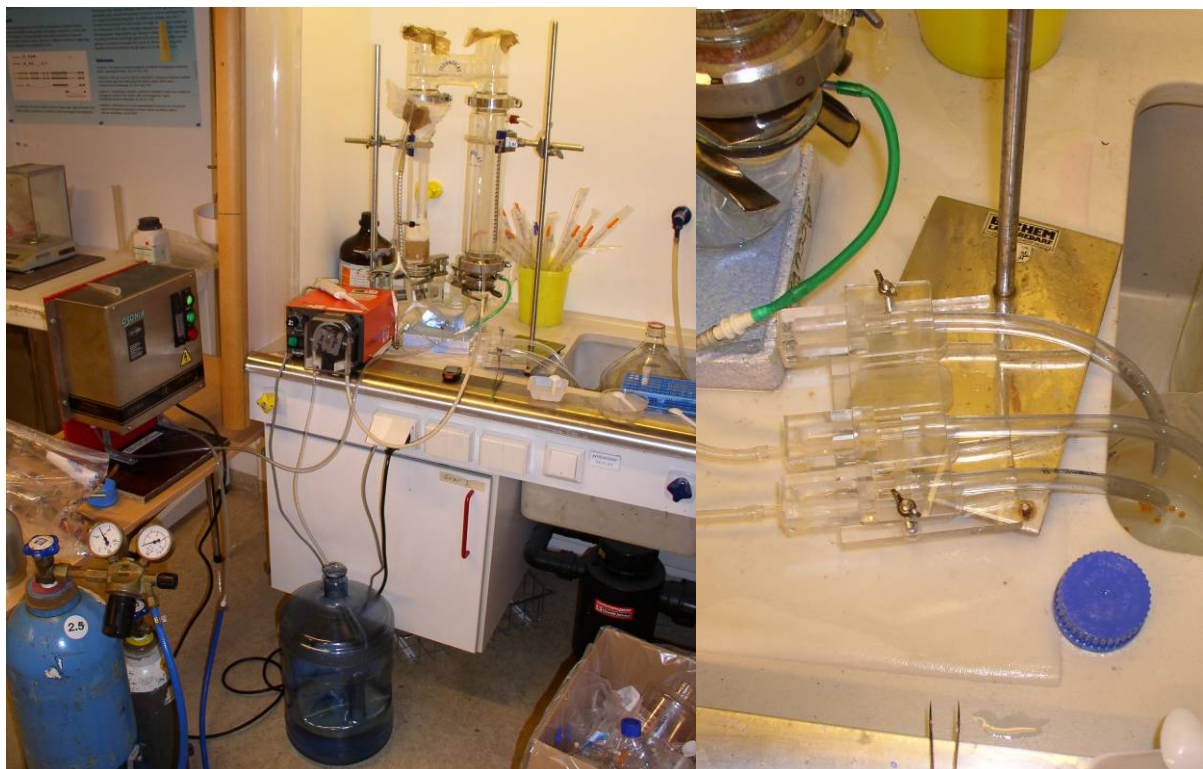
2.3.4 Kvantifisering av virus utenpå egg

For å kvantifisere antall infeksjose IPN-virus utenpå eggene ble to-og-to eller tre-og-tre egg homogenisert sammen. Homogeniseringen ble gjort i 2 ml vials ved knusing med spatel/glasstav

(forsøk 1 og 2) eller glasskule og wirl-mikser. Virustiter ble bestemt som beskrevet i 2.1.2. Siden homogenatet ofte har vist seg å ha en toksisk effekt på virusenes vertceller ble homogenatet inkubert over natten, med påfølgende skifting til friskt medie på cellene dag nr 2. Alle eggene, også kontroller, ble behandlet likt.



Figur 1. Forsøksoppsett. 3 parallelle eksponeringskammere til høyre.



Figur 2. Forsøksoppsett. De 3 parallelle eksponeringskammerene er vist til høyre.

3. Resultater og diskusjon

3.1 Eksponering av lakseegg til ozonert vann

Resultater fra forsøkene med eksponering av lakseegg for ozonert vann er vist i tabell 1. Som det framgår ble det ikke påvist negative effekter av ozoneringen, verken m.h.p. klekkeprosent eller forsinket klekking. Eventuelle senskader og feilutvikling i yngel- og påvekstfaser er ikke undersøkt i prosjektet.

Tabell 1. Antall døde egg, uklekte egg, døde yngel, samt sum døde (egg + yngel) i hver av de ozoneksponerte gruppene og i kontrollene. Vanntemperaturen ved start den 8. desember 2004 var 8,4°C, mens den ved ferdig klekking den 1. januar 2005 var 7,5°C. Yngelen ble fulgt fram til 28. februar 2005.

Prøve	Kons. mg O ₃ /l	Kontaktid min	Døde ved klekking 01.01.05	Ikke klekt	Døde etter klekking	Sum døde 28.02.05
1	0,99	1	1	2	1	4
2		2	0	0	1	1
3		4	4	0	0	4
4		8	1	1	0	2
5	1,02	1	0	1	1	2
6		2	0	3	0	3
7		4	0	1	0	1
8		8	1	0	0	1
9	0,39	1	0	1	0	1
10		2	0	0	0	0
11		4	0	2	0	2
12		8	1	0	1	2
13	4,1	8	2	1	1	4
14	4,1	4	0	2	0	2
15	1,8	2	1	0	1	2
16	1,8	1	1	2	0	3
17	Kontroll	0	0	2	0	2
18	Kontroll	0	0	2	0	2

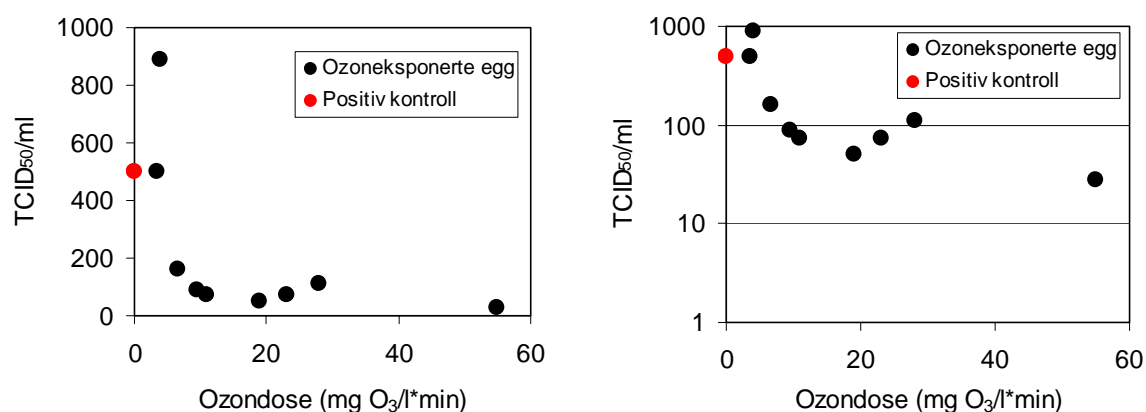
3.2 Ozonbehandling av egg med IPN-virus

3.2.1 Resultater fra virusforsøk 1

Resultatene fra forsøket er vist i tabell 2 og figur 3. I tabell 2 er virustiter (TCID₅₀/ml) vist for ulike eksponeringer. Det var et problem å få nok virus til å feste seg til eggoverflatene. En virustiter på 500 i kontrollen er for lav til å kunne dokumentere en 3-log₁₀-nedgang i virusaktivitet (99,9 % reduksjon) for de øvrige eksponeringene. Resultatene tyder imidlertid på en reduksjon i virus ved doser fra ca. 10 mg/l×min og oppover sammenliknet med kontrollen og de laveste dosene (figur 3). Det ble ikke funnet virus i prøven som var behandlet med Buffodine. Det ble bestemt å gjenta forsøkene med visse endringer for å øke viruskonsentrasjonene. De lave virustiterene ble bekreftet ved å benytte "Real Time PCR"-teknikk.

Tabell 2. Virustiter ($TCID_{50}/ml$) ved ulike eksponering.

Prøve nr.	Kontaktid min	Kons. mg O_3/l	Dose mg $O_3/l \times min$	Virustiter $TCID_{50}/ml$
Virussuspensjon				$2,8 \times 10^7$
Kontroll			0	500
P1-2	2,5	1,4	3,5	500
P1-5	5,5	1,2	6,6	160
P1-10A	10	1,1	11	73
P1-10B	10	1,1	11	
P2-2	2	2	4	890
P2-5	5	1,9	9,5	9
P2-10A	10	2,3	23	73
P2-10B	10	2,3	23	
P6-2	3,5	5,5	19	50
P6-5	5	5,5	28	110
P6-10A	10	5,5	55	28
P6-10B	10	5,5	55	

**Figur 3.** Antall aktive viruspartikler på eggene etter behandling med ulike ozondoser. 3 egg inngikk ved hvert prøveuttak.

3.2.2 Resultater fra virusforsøk 2

Resultatene fra forsøk 2 er vist i tabell 3. Begge kontrollene med egg uten virus ga positive verdier for virus. Den med lengst kontaktid overfor ozon ga høyere titere enn de positive kontrollene med egg med virus, noe som kan tyde på en toksisk effekt på virusenes vertceller. Tilsvarende ble observert for flere av prøvene, og $TCID_{50}$ -verdiene ble derfor ikke beregnet. Det er usikkert hva den toksiske effekten kan skyldes, også siden denne toksiske effekten så ut til å slå ut nokså tilfeldig. Selve egg-homogenatet kan være en viktig kilde.

Igjen viste den positive kontrollen med egg med virus svært lav virustiter, slik at noen 3- \log_{10} -nedgang uansett ikke kunne bestemmes. Forklaringen på de svært lave verdiene kan ligge i at virus ble vasket av eggoverflatene i gjennomstrømningsreaktoren som ble benyttet. Dersom bindingene er svake mellom egg og virus vil skjærkreftene som gjennomstrømningen representerer kunne rive løs virus.

Tabell 3. Ozonkonsentrasjoner, kontakttider og doser som ble benyttet.

Prøve nr.	Kontakttid	Kons.	Dose	Virustiter
	min	mg O ₃ /l	mg O ₃ /l.min	TCID ₅₀ /ml
Virussuspensjon	10	0	0,0	1,9×10 ⁶
Kontroll: egg uten virus	2	9,35	18,7	32
	10	10,20	102,0	78000
Kontroll: egg med virus	2	0,00	0,0	178
	10	0,00	0,0	32
P1 - 2	2	0,37	0,7	-
P1 - 10A	10	0,70	7,0	-
P1 - 10B	10	0,89	8,9	-
P4 - 2	2	3,98	8,0	-
P4 - 10A	10	4,92	49,2	-
P10 - 2	2	8,90	17,8	-
P10 - 10A	10	18,60	186,0	-
P10 - 10B	10	8,36	83,6	-

3.2.3 Resultater fra virusforsøk 3

Titer-resultatene for alle testene er gitt i Tabell 4. Igjen så det ut til at homogenatene av egg (uten alginat) var toksisk for virusenes vertceller; alle cellene i de to til tre første brønnrekkene ble ødelagt (cytopatogen effekt) for alle parallellene, noe som tyder på at det er homogenatet i seg selv som tar livet av cellene¹. Imidlertid synes metoden med virus i alginatgel å ha fungert godt, og ga virus-titere fra 10³ til 10⁴ i kontrollene (egg med alginat som ble eksponert til ozonfritt vann i gjennomstrømningsreaktoren). Her ble det observert en nedgang i virustiter med økende ozondose.

Figur 4 oppsummerer resultatene for eggene med virus innstøpt i alginat. Legg merke til at y-aksen viser virus-titer (TCID₅₀) i logaritmisk skala. Laveste deteksjonsgrense er en virus-titer på 10 pr. ml. Målte ozonkonsentrasjoner under eksponeringen og beregnet ozondose er gitt i Tabell 4. Ozondose er produktet av konsentrasjon og eksponeringstid.

Økende ozondose ga en klar tendens til økt inaktivering, men med relativt stor variabilitet. Ikke uventet ble best resultat oppnådd med høy ozonkonsentrasjon. Ved 10,5 mg O₃/l fikk man full inaktivering til under deteksjonsgrensen med en virus-titer på <10 pr ml allerede ved 2 min eksponering. Dette tilsvarer en inaktivering på tilnærmet 99,9 %. Lavere ozonkonsentrasjoner (0,9-1,3 mg O₃/l og 2,8-3,1 mg O₃/l) ga noe dårligere resultat. Den høye ozonkonsentrasjonen ga trolig bedre penetrering av alginatgelen og dermed høyere ozonkonsentrasjon i gelen. Imidlertid ble det også oppnådd i overkant av 99 % inaktivering etter 10 min ved 2,8 mg O₃/l.

Den tidligere nevnte variabilitet i resultatene kan skyldes faktorer som:

- Ujevn alginatfilmtykkelse

¹ Den lave virustiteren (lave konsentrasjonen av virus på eggene) gjorde at det ikke var mulig å fortynne seg ut av problemet og påvise dette direkte. Dette er et problem vi ofte har hatt, der de to første fortynningene av homogenatet tar livet av cellene uansett virusmengde. Vi forsøkte å bedre dette ved å inkubere homogenatet over natten, for så å skifte til friskt medie på cellene, uten at dette hjalp. (Grunnen til at det i det tredje forsøket stort sett er tre fortynninger som har gitt cytopatogen effekt er at vi forsøkte med ufortynnet homogenat i første brønn som et forsøk på å øke følsomheten dersom det ekstra vaskesteget reduserte toksisiteten på cellene.) Hadde man ikke hatt noen toksisk effekt av egghomogenatet på vertcellene ville man forventet minimal/ingen cytopatogen effekt på eggene som ikke var utsatt for virus (dvs kontrollen).

- Usikkerhet i bestemmelse av faktisk ozondose; denne er bestemt av ozonkonsentrasjonen i vannfasen og diffusjonshastigheten av ozon innover i alginatgelen, ozonforbruket inne i gelen, diffusjonshastigheten av tiosulfat i alginatgelen.
- Rester av alginat på eggene etter oppløsning i PBS = tap av virus
- Tap av alginat under ozoneksponeringen. Forsøk gjort i forkant med rene alginatkuler antydnet at alginatgelen er stabil over tid (>20 min) ved en ozonkonsentrasjon på 1,3 mg O₃/l (i 0,01 M CaCl₂).

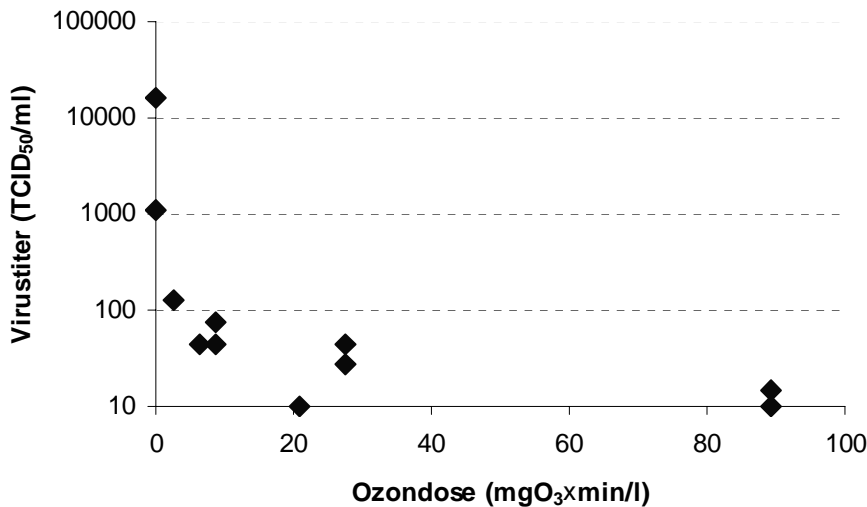
Standard behandling med Buffodine ga ikke god inaktivering av IPN-virus i alginatgel. Det kan forklares med at Buffodin har reagert med alginat.

Saltinnholdet i vannet som ble benyttet kan ha påvirket effekten av ozon overfor virus, men trolig heller redusert enn økt denne. Dette forklares med at de oksidantene som eventuelt dannes ved ozonering av vann tilsatt NaCl, d.v.s. hypoklorittion (OCl⁻) og hypoklorsyre (HOCl), generelt er svakere desinfektanter enn ozon. Nå skal det også bemerkes at trolig bare små mengder aktivt klor dannes siden kloridion er tungt oksiderbart. Forskjellen i diffusjonshastigheten innover i alginatgelen av ozon i forhold til HOCl er sannsynligvis ikke særlig stor og dermed av mindre betydning.

Tabell 4. Resultat fra virustiterbestemmelse.

Gruppe	Ozonkons.	Eksp.tid	Dose (kons*tid)	Kommentar	Virustiter TCID ₅₀ /ml
	mg O ₃ /l	min	mg O ₃ ×min/l		
Kontroll 1-1	-	-	-	Virussuspensjon	6,0×10 ⁶
Kontroll 1-2	-	-	-	Virus m. alginat (1: 4)	2,3×10 ⁵
Kontroll 3 -1	0	2	0	Egg med virus	3,8×10 ² *
Kontroll 3 -2	0	10	0	Egg med virus	3,8×10 ² *
Kontroll 5-1	0	2	0	Egg m. alginat med virus	1,1×10 ³
Kontroll 5-2	0	10	0	Egg m. alginat med virus	1,6×10 ⁴
Kontroll 6-1	5,9	2	11,8	Egg uten virus	<10 ⁰
Kontroll 6-2	-	-	-	Egg uten virus	3,8×10 ² *
Kontroll 7-1	5,4	2	10,8	Egg m.alginat uten virus	<10 ⁰
Kontroll 7-2	-	-	-	Egg m.alginat uten virus	<10 ⁰
Alginat				Alginat uten virus	<10 ⁰
P1-2	0,8	3	2,4	Egg med virus (90 min eksponering) – ødelagte celler	1,1×10 ³ *
P1-10A	0,8	10	8,0		1,1×10 ³ *
P1-10B	0,8	10	8,0		1,1×10 ³ *
P4-2	2,6	2	5,2		6,4×10 ² *
P4-10A	2,0	10	20		6,4×10 ² *
P4-10B	2,0	10	20		6,4×10 ² *
P10-2	5,6	2	11,2		1,1×10 ³ *
P10-10A	5,5	10	11,0		1,1×10 ³ *
P10-10B	5,5	10	11,0		6,4×10 ² *
Palg1-2	1,3	2	2,6	Egg med virus i alginat	1,3×10 ²
Palg1-10A	0,9	10	9,0		4,4×10 ¹
Palg1-10B	0,9	10	9,0		7,5×10 ¹
Palg4-2	3,1	2	6,2		4,4×10 ¹
Palg4-10A	2,8	10	28		2,8×10 ¹
Palg4-10B	2,8	10	28		4,4×10 ¹
Palg10-2	10,5	2	21		<10 ⁰
Palg10-10A	8,9	10	89		1,5×10 ¹
Palg10-10B	8,9	10	89		<10 ⁰
P-Bufferdine 1 %	-	10	-	Referanse – egg med virus (uten alginat)	1,1×10 ³
Palg-Bufferdine 1 %	-	10	-	Referanse -alginat med virus	3,8×10 ²
Palg-Bufferdine 1 %	-	10	-	Referanse -alginat med virus	3,8×10 ²

* Cellene for deteksjon av virus ødelagt som følge av cytopatogen effekt, sannsynligvis forårsaket av egg-homogenatene (eggene ble knust og homogenisert for å kunne detektere alle aktive virus festet til eggene).

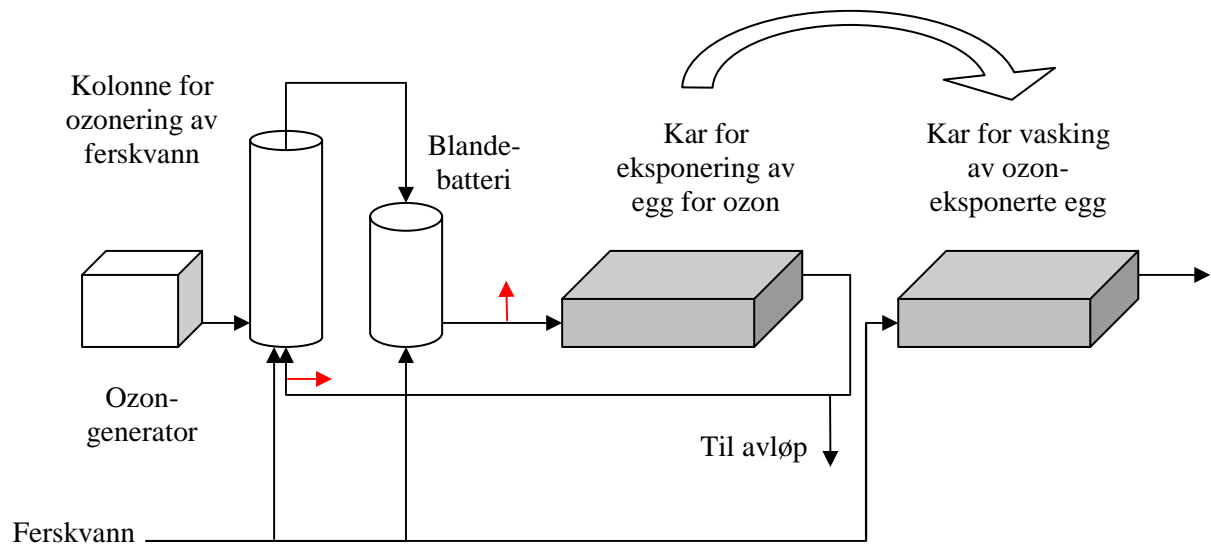


Figur 4. Antall levende virus som funksjon av ozondose for eggene med virus i alginat. Deteksjonsgrensen for metoden er 10 TCID₅₀/ml.

3.2.4 Forslag til prosessløsning for desinfisering av egg med ozon i fullskala

Ozondesinfiseringen kan skje som et "vasketrinn" plassert under et godt avtrekk, der preozonert vann kontinuerlig tilsettes eksponeringskaret under desinfiseringen for å kompensere for ozonforbruket og dermed oppnå en restkonsentrasjon i karet. Eggene kan overføres til eksponeringskaret ved hjelp av et nett eller lignende. Etter endt eksponering vaskes eggene raskt i et vaskekar med rentvann. Se figur 5.

Rentvann ozoneres i en kolonne/sirkulasjonsreaktor (for effektiv overføring av ozongass til vannet) og sendes via et blandebatteri for justering av ozonkonsentrasjonen med rentvann og videre til eksponeringskaret (figur 5). Vannet fra eksponeringskaret går tilbake til kolonnen for reozonering. Overskuddsvann går til avløp. Det tas regelmessig prøver (røde piler i figuren) fra utløpet av blandebatteriet og på utløpet av eksponeringskaret for måling og dokumentering av restozon. Ozonkonsentrasjonen i innløpet til eksponeringskaret må ikke overskride den definerte tålegrensen til eggene overfor ozon (med god sikkerhetsmargin), mens utløpskonsentrasjonen definerer nødvendig eksponeringstid i karet for å gi ønsket desinfeksjonseffekt.



Figur 5. Forslag til prosessløsning for desinfisering av egg med ozon i fullskala.

4. Referanser

Ashbury, C. and Coler R. 1980. Toxicity of dissolved ozone to fish eggs and larvae. Jour. Water Poll. Control Fed., 52, 1990-1996.

Berman D., Rice E.W. and Hoff J.C. (1988). Inactivation of particle associated coliforms by chlorine and monochloramine. Applied and Environmental Microbiology 54, 507-512.

Grotmol, S., Totland, G.K., 2000. Surface disinfection of Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* eggs with ozonated sea-water inactivates nodavirus and increases survival of the larvae. Diseases of Aquatic Organisms 39, 89-96.

Grotmol S., Dahl-Paulsen E. and Totland G.K. 2003. Hatchability of eggs from Atlantic cod, turbot and Atlantic halibut after disinfection with ozonated seawater. Aquaculture, 221, 245-254.

Liltved H., Vogelsang C., Modahl I. and Dannevig B.H. 2006. High resistance of fish pathogenic viruses to UV irradiation and ozonated seawater. Aquacultural Engineering, 34/2, 72-82.

Rosseland, B.O., Håstein, T., Torgersen, Y., Backer, J.G. og Andersen, S. 1991. Desinfeksjon av rogn med Buffodin R. Virkning av Buffodinbehandling på øyerogn av ørret (*Salmo trutta* L.) og nybefruktet egg og øyerogn av laks (*Salmo salar* L.). NIVA rapport F-530, 22 s.

VESO 2003. Fakta om IPN. Rapport utarbeidet på grunnlag av Review og Erfaringskartlegging – 2003. 11 s.